

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/000231

International filing date: 10 January 2005 (10.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 002 257.7
Filing date: 09 January 2004 (09.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 March 2005 (21.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/EP200 5/ 0 0 0 2 3 1

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

04.03.2005



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 10 2004 002 257.7

Anmeldetag: 09. Januar 2004

Anmelder/Inhaber: Epigenomics AG, 10435 Berlin/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-
Methylierungen in DNA mit Hilfe von DNA-
Reparaturenzymen

IPC: C 12 Q 1/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. Februar 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Wehner

Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in DNA mit Hilfe von DNA-Reparaturenzymen

5

Hintergrund der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in DNA. 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryontischer Zellen. Sie spielt eine wichtige biologische Rolle, u.a. bei der Transkriptionsregulation, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese (zur Übersicht: Millar et al.: Five not four: History and significance of the fifth base. In: The Epigenome, S. Beck and A. Olek (eds.), Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3-20). Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichen Interesse. Ein Nachweis der Methylierung ist allerdings schwierig, da Cytosin und 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweisen. Viele der herkömmlichen, auf Hybridisierung beruhenden Nachweisverfahren vermögen daher nicht zwischen Cytosin und Methylcytosin zu unterscheiden. Zudem geht die Methylierungsinformation bei einer PCR-Amplifikation vollständig verloren.

25

Die herkömmlichen Methoden zur Methylierungsanalyse arbeiten im wesentlichen nach zwei unterschiedlichen Prinzipien. Zum einen werden methylierungsspezifische Restriktionsenzyme benutzt, zum anderen erfolgt eine selektive chemische Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil (sog.: Bisulfit-Behandlung, siehe etwa: DE 101 54 317 A1; DE 100 29 915 A1). Die enzymatisch oder chemisch vorbehandelte DNA wird dann meist amplifiziert

und kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden
(zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff). Von großem Interesse sind dabei Verfahren, die in der Lage sind, Methylierung sensitiv und quantitativ zu detektieren. Dies
5 gilt aufgrund der wichtigen Rolle der Cytosin-Methylierung in der Krebsentstehung insbesondere in Hinblick auf diagnostische Anwendungen. Von besonderer Bedeutung sind dabei Methoden, die es erlauben, abweichende Methylierungsmuster in Körperflüssigkeiten, etwa in Serum,
10 nachzuweisen. Denn anders als die instabile RNA ist DNA oft in Körperflüssigkeiten anzutreffen. Bei destruktiven pathologischen Prozessen wie Krebserkrankungen ist die DNA-Konzentration im Blut sogar erhöht. Eine Krebsdiagnostik über eine Methylierungsanalyse von in Körperflüssigkeiten befindlicher Tumor-DNA ist also möglich und
15 schon mehrfach beschrieben (siehe etwa: Palmisano et al.: Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. Cancer Res. 2000 Nov 1;60(21):5954-8). Ein besonderes Problem besteht jedoch darin, dass
20 sich in den Körperflüssigkeiten neben der DNA mit dem krankheitstypischen Methylierungsmuster eine große Menge an DNA der gleichen Sequenz aber eines anderen Methylierungsmusters befindet. Die Diagnoseverfahren müssen daher in der Lage sein, geringe Mengen besonders methylierter
25 DNA vor einem starken Hintergrund an DNA derselben Sequenz aber eines anderen Methylierungsmusters (im folgenden: Hintergrund-DNA) nachzuweisen.

Die herkömmlichen Verfahren zur Methylierungsanalyse lösen dieses Problem nur eingeschränkt. Üblicherweise wird
30 die chemisch vorbehandelte DNA mittels eines PCR-Verfahrens amplifiziert. Über die Verwendung methylier-

runungsspezifischer Primer oder Blocker soll dann eine selektive Amplifikation nur der methylierten (bzw. bei umgekehrten Ansatz: unmethylierten) DNA gewährleistet werden. Der Einsatz methylierungsspezifischer Primer ist als

5 sog. „methylierungssensitive PCR“ bekannt („MSP“; Herman et al.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9821-6). Ein vergleichbar sensitives

10 Verfahren ist die sogenannte „Heavy Methyl“-Methode. Dabei wird eine spezifische Amplifizierung nur der ursprünglich methylierten (bzw. unmethylierten) DNA durch Einsatz von methylierungsspezifischen Blocker-Oligomeren erreicht (zur Übersicht: WO 02/072880). Sowohl MSP wie

15 Heavy Methyl sind als quantifizierbare Real-Time-Varianten anwendbar. Diese ermöglichen es, den Methylierungsstatus weniger Positionen direkt im Verlauf der PCR nachzuweisen, ohne dass eine nachfolgende Analyse der Produkte erforderlich wäre („MethyLight“ - WO00/70090; US

20 6,331,393). Eine Ausführungsform ist dabei das „Tagman“-Verfahren. Dieses verwendet Sondenmoleküle, die ein Fluoreszenzfarbstoff-Quencher-Paar tragen. Die Sonden hybridisieren sequenzspezifisch an die Amplifikate und werden im Zuge des nächsten Amplifikationszyklus durch die Exonuklease-Aktivität der Polymerase abgebaut. Durch die

25 Trennung von Quencher und Farbstoff entsteht ein detektierbares Fluoreszenz-Signal (siehe etwa Eads et al.: MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Res. 2000 Apr 15;28(8):E32). Eine weitere MethyLight-Ausführungsform ist das sog. Lightcycler-Verfahren. Dabei werden zwei unterschiedliche Sonden

30 eingesetzt, die in unmittelbarer Nähe zueinander an das Amplifikat hybridisieren, und die dann über Fluoreszenz-

Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ein detektierbares Signal erzeugen.

Die Anwendbarkeit dieser Verfahren für einen sensitiven und spezifischen Nachweis methylierter DNA vor einem großen Hintergrund an unmethylierter DNA ist allerdings beschränkt. So besteht die Gefahr, dass es über eine unspezifische Amplifikation von Hintergrund-DNA zu falsch-positiven Ergebnissen kommt. Um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen ist es daher notwendig, Primer- oder Blockersequenzen zu verwenden, in den mehrere methylierungsspezifische Positionen enthalten sind. Diese Sequenzanforderungen schränken die Anwendbarkeit des Verfahrens wiederum ein.

Aufgrund der besonderen biologischen und medizinischen Bedeutung der Cytosin-Methylierung und aufgrund der oben erwähnten Nachteile des Standes der Technik besteht ein großes technisches Bedürfnis an der Entwicklung leistungsfähiger Methoden zur Methylierungsanalyse. Im folgenden ist ein solches Verfahren beschrieben.

Erfindungsgemäß wird die zu untersuchende DNA zunächst chemisch vorbehandelt, danach mit Oligonukleotidsonden hybridisiert und anschließend mit DNA-Reparaturenzymen umgesetzt. Eine Ausführungsform der Erfindung erlaubt so einen spezifischen Abbau der Hintergrund-DNA. Damit wird eine selektive Amplifikation allein derjenigen DNA, deren Methylierungsstatus nachgewiesen werden soll, erleichtert. Eine sehr sensitive und sehr spezifische Methylierungsanalyse ist möglich. Der Anwendungsbereich des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dabei breiter als der der

bereits bekannten Methodik (s.o.). Denn methylierungsspezifische Primer- oder Blockersequenzen sind nicht in gleichem Maße erforderlich.

- 5 Eine andere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens benutzt die Hybridisierung und den Einsatz der DNA-Reparaturenzyme nicht zum Abbau der Hintergrund-DNA, sondern direkt zum Nachweis des Methylierungsstatus. Ein ähnliches Verfahren zur Mutationsanalyse ist unter dem
- 10 Namen „Midas“ beschrieben (Bazar et al: Mutation identification DNA analysis system (MIDAS) for detection of known mutations. Electrophoresis. 1999 Jun;20(6):1141-8; US-Patent 5,656,430). Dabei wird ein Oligonukleotid an die zu untersuchende DNA hybridisiert. An der nachzuwei-
- 15 sendenden Mutation bildet sich eine Basenfehlpaarung, die anschließend durch ein Mismatch Repair Enzym erkannt wird. Die Sonde wird an dieser Stelle geschnitten, und die Fragmente können über unterschiedliche Methoden nach-
- 20 gewiesen werden. Wird ein Überschuss an Sonden verwendet, so kann der Prozess wiederholt ablaufen. Ein weiteres ähnliches Verfahren zur Mutationsanalyse ist von Zhang et al. beschrieben (An amplification and ligation-based method to scan for unknown mutations in DNA. Hum Mutat. 2002 Aug;20(2):139-47). Dabei wird die zu untersuchende
- 25 DNA zunächst mittels einer PCR amplifiziert. Anschließend erfolgt eine Crosshybridisierung der Amplifikate unter Bildung von Basenfehlpaarungen. Danach werden durch Umsatz mit Reparaturenzymen Einzelstrangbrüche eingeführt. Schließlich werden an die geschnittene DNA spezifisch
- 30 Primer ligiert, mit deren Hilfe die Mutation spezifisch nachgewiesen werden kann.

Die Anwendung dieser beiden Verfahren auf die Methylierungsanalyse wird im folgenden zum ersten Mal beschrieben. Aufgrund der besonderen biologischen und medizinischen Bedeutung der Cytosinmethylierung und aufgrund der Nachteile der bekannten Verfahren stellt das Eröffnen dieser vorteilhaften, neuen Technologie einen wichtigen technischen Fortschritt dar.

Beschreibung

Das erfindungsgemäße Verfahren verwendet DNA-Reparaturenzyme zur Analyse von Cytosinmethylierungen. Die Erfindung beruht dabei auf folgendem Prinzip: Zunächst wird die zu untersuchende DNA so umgewandelt, dass sich ursprünglich methylierte und unmethylierte DNA in ihrer Basensequenz unterscheiden. Anschließend wird die zu untersuchende DNA mit Oligonukleotiden hybridisiert. Dabei bilden sich je nach Methylierungsstatus der DNA entweder Hybride mit Fehlpaarungen oder Hybride ohne Fehlpaarungen. In einer anderen Ausführungsform bilden sich je nach Methylierungsstatus der DNA entweder Hybride mit Fehlpaarungen oder keine Hybride. Die fehlgepaarten Hybride werden von den DNA-Reparaturenzymen erkannt und geschnitten. Anschließend kann auf unterschiedliche Weise der Methylierungszustand der DNA bestimmt werden.

Demnach handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren um ein Verfahren zur Analyse von Cytosinmethylierungen, das dadurch gekennzeichnet ist, dass

- a) die zu untersuchende DNA chemisch oder enzymatisch so umgesetzt wird, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,

- 5 b) die umgewandelte DNA mit Oligonukleotiden hybridisiert wird, wobei die DNA des einen Methylierungsstatus Hybride mit Basenfehlpaarungen bildet, während die DNA des anderen Methylierungsstatus Hybride ohne Basenfehlpaarungen oder keine Hybride bildet,
- c) ein Strang der fehlgepaarten Hybride enzymatisch geschnitten wird,
- 10 d) die ungeschnittene DNA oder die geschnittenen Fragmente nachgewiesen werden,
- e) aus dem Signal auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen wird.

15 Das erfindungsgemäße Verfahren ist in zwei prinzipiell unterschiedlichen Ausführungsformen durchführbar. In der ersten Variante werden genau an den Positionen, deren Methylierungsstatus untersucht werden soll, Basenfehlpaarungen gebildet. Demnach bilden sich bei der Hybridisierung entweder Hybride mit oder ohne Basenfehlpaarungen.

20 In der zweiten Variante werden die Basenfehlpaarungen außerhalb der zu untersuchenden Positionen gebildet. Je nach Methylierungsstatus der DNA bilden sich dann Hybride mit Basenfehlpaarungen oder keine Hybride.

25 Die erste Ausführungsform ist also dadurch gekennzeichnet, dass oben in Schritt b) die DNA des einen Methylierungsstatus Hybride mit Basenfehlpaarungen bildet, während die DNA des anderen Methylierungsstatus Hybride ohne Basenfehlpaarungen bildet.

30 Im ersten Schritt dieser Ausführungsform wird die zu untersuchende DNA mit einer Chemikalie oder mit einem Enzym so umgesetzt, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet. Dabei kann die zu un-

35

tersuchende DNA je nach diagnostischer oder wissenschaftlicher Fragestellung aus unterschiedlichen Quellen stammen. Für diagnostische Fragestellungen dienen als Ausgangsmaterial bevorzugt Gewebeproben, aber auch Körperflüssigkeiten, insbesondere Serum. Möglich ist auch, die DNA aus Sputum, Stuhl, Urin oder Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit zu verwenden. Vorzugsweise wird die DNA zunächst aus der biologischen Probe isoliert. Die DNA-Extraktion erfolgt nach Standardmethoden, aus Blut etwa unter Verwendung des Qiagen UltraSens DNA Extraktions-Kits. Die isolierte DNA kann dann z.B. durch Umsatz mit Restriktionsenzymen fragmentiert werden. Die Reaktionsbedingungen und die in Frage kommenden Enzyme sind dem Fachmann bekannt und ergeben sich etwa aus den von den Herstellern mitgelieferten Protokollen. Anschließend wird die DNA chemisch oder enzymatisch umgewandelt. Bevorzugt erfolgt eine chemische Umsetzung mittels Bisulfit. Die Bisulfitumwandlung ist dem Fachmann in unterschiedlichen Variationen bekannt (siehe etwa: Frommer et al.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Mar 1;89(5):1827-31; Olek, A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15;24(24):5064-6.; DE 100 29 915; DE 100 29 915). Besonders bevorzugt erfolgt die Bisulfitumwandlung in Gegenwart von denaturierenden Lösemitteln, etwa Dioxan, und eines Radikalfängers (vgl.: DE 100 29 915). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die DNA nicht chemisch, sondern enzymatisch umgewandelt. Dies ist etwa durch Einsatz von Cytidin-Deaminasen denkbar, die unmethylierte Cytidine schneller umsetzen als methylierte

Cytidine. Ein entsprechendes Enzym ist kürzlich identifiziert worden (Bransteitter et al.: Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):4102-7).

Durch die chemische oder enzymatische Vorbehandlung werden methylierte und unmethylierte DNA in unterschiedliche DNA-Sequenzen überführt. Dabei unterscheiden sich die Sequenzen nur an denjenigen Positionen, an den vorher ein unterschiedlicher Methylierungsstatus vorlag. Nach einer Bisulfitbehandlung liegt an einer ursprünglich methylierten Cytosinposition ein Cytosin vor, während an einer ursprünglich unmethylierten Cytosinposition ein Uracil auftritt. Im übrigen sind beide DNA-Sequenzen identisch. Dieses macht sich erfindungsgemäß zunutze, indem man nachfolgend an die umgewandelte DNA Oligonukleotide hybridisiert. Dabei sind die Oligonukleotide vollständig komplementär nur zu einer der umgewandelten Sequenzen. Die andere Sequenz bildet mit den Oligonukleotiden an den unterschiedlich methylierten Positionen Basenfehlpaarungen.

Im zweiten Schritt des erfindungsgemäße Verfahren wird demnach die umgewandelte DNA mit Oligonukleotiden hybridisiert, wobei je nach Methylierungsstatus der DNA Hybride mit oder ohne Basenfehlpaarungen gebildet werden.

Bei bisulfitbehandelter DNA kommt dabei nur eine begrenzte Art an Basenfehlpaarungen in Betracht. So enthält die ursprünglich unmethylierter DNA ein Uracil an der Stelle, an der sich im methylierten Strang ein Cytosin befindet.

Dementsprechend kann es je nach der Sequenz des eingesetzten Oligonukleotids zu U \leftrightarrow G oder zu C \leftrightarrow A Fehlpaarungen kommen. Wird die zu untersuchende DNA nach der Bisulfitbehandlung zunächst amplifiziert, so können weitere Fehlpaarungen ausgenutzt werden. Werden im Zuge der Amplifikation statt Uracil- Thyminnukleosidtriphosphate angeboten, so steht anschließend auch eine T \leftrightarrow G-Fehlpaarung zur Verfügung. Zudem können nach einer Amplifikation auch erstmals die komplementären Stränge untersucht werden (durch die Bisulfitumwandlung entstehen zunächst nur zwei DNA-Stränge, die nicht mehr miteinander komplementär sind). Möglich ist es daher auch, A \leftrightarrow C oder G \leftrightarrow T Fehlpaarungen auszunutzen. Es liegt nahe, dass es zu weiteren Fehlpaarungen kommen kann, wenn die Oligonukleotide andere als die herkömmlichen DNA-Basen enthalten. Trägt die Sonde etwa Uracil statt Thymin, so können treten auch G \leftrightarrow U-Fehlpaarungen auftreten. Entsprechende Ausführungsformen sind von dieser Anmeldung eingeschlossen.

Welche der oben genannten Fehlpaarungen erfindungsgemäß zum Methylierungsnachweis verwendet werden, hängt von der zu untersuchenden Fragestellung, vom dem weiteren experimentellen Vorgehen und von den eingesetzten Enzymen ab. Gleiches gilt für die Frage, ob die eingesetzten Oligonukleotide die fehlgepaarten Hybride mit der nachzuweisenden DNA oder mit der Hintergrund-DNA bilden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist hier in unterschiedlichen Variationen ausführbar.

In einer Ausführungsform der Erfindung bildet diejenige DNA fehlgepaarte Hybride, deren Methylierungsstatus (methyliert bzw. unmethyliert) nachgewiesen werden soll. In den folgenden Schritten wird die Oligonukleotid-Komponente dieser Hybride dann enzymatisch geschnitten. Die Oligonukleotid Fragmente werden von der DNA getrennt

und anschließend detektiert. Aus dem Signal lässt sich auf den Methylierungsstatus der DNA schließen. Durch einen Überschuss an Oligonukleotiden lässt sich der Prozess wiederholen. Das Signal kann so amplifiziert werden (Midas-Verfahren, siehe ausführlich unten).

In einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens bildet die Hintergrund-DNA fehlgepaarte Hybride. Die DNA, deren Methylierungsstatus nachgewiesen werden soll, bilden dagegen Hybride ohne Fehlpaarung. Anschließend wird mit Hilfe eines Enzyms spezifisch die Hintergrund DNA geschnitten (anders dagegen das oben beschriebene Verfahren; dort wird die Oligonukleotidkomponente der fehlgepaarten Hybride geschnitten). Schließlich erfolgt ein Nachweis der nicht geschnittenen DNA. Welche Basenfehlpaarungen ausgenutzt werden, hängt auch in dieser Ausführungsform von der Spezifität der im nächsten Schritt verwendeten Enzyme ab (s.u.).

In dem dritten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Strang der fehlgepaarten Hybride enzymatisch geschnitten. Je nach Ausführungsform handelte es sich dabei um die Oligonuklotid- oder die DNA-Komponente (s.o.). Die eingesetzten Enzyme müssen in der Lage sein, die oben beschriebenen Fehlpaarungen zu erkennen und die Hybride an diesen Stellen zu schneiden. Hierfür eignen sich insbesondere DNA-Reparaturenzyme. Dabei handelt es sich zu meist um DNA-Glykosylasen, die die glykosidische Bindung zwischen der Base und dem Zucker-Phosphatrückgrat spalten. Oft besitzen die DNA-Glykosylasen gleichzeitig eine Apurin/Apyrimdin (AP)-Lyase-Aktivität, die zu einer Spaltung des Rückgrats führt (zur Übersicht: Memisoglu and Samson: Base excision repair in yeast and mammals. Mutat Res. 2000 Jun 30;451(1-2):39-51). Für das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere das TDG-Protein. Hierbei handelt es sich um eine Thymin-DNA-Glykosylase,

die T<->G-Fehlpaarungen erkennt und nur den Strang mit dem T spaltet. Auch thermostabile Varianten des TDG-Protein sind bekannt (Horst and Fritz: Counteracting the mutagenic effect of hydrolytic deamination of DNA 5-methylcytosine residues at high temperature: DNA mismatch N-glycosylase *Mig*. *Myth of the thermophilic archaeon Methanobacterium thermoautotrophicum* EMBO J. 1996 Oct 1;15(19):5459-69). Für das erfindungsgemäße Verfahren ist weiterhin besonders geeignet die MutY DNA-Glykosylase.

5 Diesem Enzym erkennt spezifisch A<->G-Fehlpaarungen und spaltet nur den A-Strang (vgl.: Lu and Hsu: Detection of single DNA base mutations with mismatch repair enzymes. *Genomics*. 1992 Oct;14(2):249-55). Ein weiteres besonders geeignete Enzym ist das Mug-Protein. Dieses erkennt spezifisch U<->G-Fehlpaarungen (vgl.: Lutsenko and Bhagwat: The role of the Escherichia coli mug protein in the removal of uracil and 3,N(4)-ethenocytosine from DNA. *J Biol Chem*. 1999 Oct 22;274(43):31034-8). Alle drei genannten Enzyme sind kommerziell erhältlich (Trevigen Inc., 8405

10 Helgerman Court, Gaithersburg, MD 20877 USA; www.trevigen.com). Zum Stand der Technik gehören eine Vielzahl weiterer Reparaturenzyme (siehe etwa: Wood et al.: Human DNA repair genes. *Science*. 2001 Feb 16;291(5507):1284-9; US 5,656,430). Dem Fachmann ist bekannt, dass Reparaturenzyme, die nicht in der Lage sind, das Zucker-Phosphat-Rückgrat zu spalten, auch in Kombination mit Lyasen oder Endonukleasen eingesetzt werden können (vgl.: Bazar et al a.a.o 1999; US 5,656,430, Spalte 5

15 Z 23 ff). Es ist ebenfalls bekannt, dass AP-Positionen auch physikalisch oder durch Umsatz mit Chemikalien, etwa mit NaOH gespalten werden können (vgl.: Horst and Fritz a.a.o., 1996). Wird die enzymatisch behandelte DNA später amplifiziert, so ist es zudem denkbar, die AP-Positionen ohne weitere Behandlung einzusetzen. Denn es ist zu erwarten, dass eine Amplifikation der abasischen DNA nur

20 eingeschränkt erfolgt. Zudem schließt das erfindungsgemä-

ße Verfahren Ausführungsformen mit ein, in denen beide Stränge des fehlgepaarten Hybrids geschnitten werden.

5 Im vierten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die ungeschnittene DNA oder die geschnittenen Fragmente nachgewiesen. Je nach vorherigem experimentellen Aufbau sind hier unterschiedliche Ausführungsformen möglich. In der Midas-Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt ein Nachweis der geschnittenen Oligonukleotidfragmente. Dem Fachmann sind hier eine Vielzahl von
10 technischen Detektionsmöglichkeiten geläufig, etwa über Gel- oder Kapillarelektrophore oder über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET, vgl.:US 5,656,430).

15 In Ausführungsformen, in denen die Reparaturenzyme eingesetzt werden, um die Hintergrund-DNA zu entfernen, kann die ungeschnittenen DNA anhand der gängigen molekularbiologischen Verfahren analysiert werden, etwa über Hybridisierung oder Sequenzierung. Bevorzugt wird die umgewandelte DNA zunächst mit einer Polymerasekettenreaktion
20 amplifiziert (s.u.). Besonders bevorzugt verlaufen Einsatz des Reparaturenzyms und Amplifikation parallel. Dies ist etwa bei Verwendung thermostabiler Enzyme möglich (s.u.).

25 Im fünften Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird aus dem Signal auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen. Dies geschieht je nach vorherigem experimentellen Vorgehen nach dem Stand der Technik.

30

Im folgenden sind besondere Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens beschrieben.

In einer ersten besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt das erfindungsgemäße Verfahren ähnlich zu dem bereits in der Mutationsanalyse eingesetzten Midas-Verfahren (Bazar et al., a.a.o. 1999; US 5,656,430). Diese Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass folgende Schritte ausgeführt werden:

- a) die zu untersuchende DNA wird chemisch oder enzymatisch so umgesetzt, dass 5-Methylcytosin unverändert bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil oder in eine andere Base umgewandelt wird, die sich im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,
- b) die umgewandelte DNA wird mit Oligonukleotiden hybridisiert, wobei die nachzuweisende DNA Hybride mit Basenfehlpaarungen bildet,
- c) der Oligonukleotid-Strang der fehlgepaarten Hybride wird enzymatisch geschnitten,
- d) die geschnittenen Oligonukleotid-Fragmente werden nachgewiesen,
- e) aus dem Signal wird auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen.

In dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die zu untersuchende DNA zunächst wie oben beschrieben chemisch oder enzymatisch vorbehandelt. Bevorzugt erfolgt eine Bisulfitbehandlung. Durchführungsweise und Reaktionsbedingungen sind dem Fachmann bekannt (vgl.: Frommer et al., a.a.o. 1992; Olek et al., a.a.o. 1996; DE 10029915; DE 10029915). Danach kann eine Amplifikation der DNA erfolgen. Die umgewandelte DNA wird anschließend an Oligonukleotide hybridisiert, wobei die nachzuweisende (methylierte bzw. unmethylierte) DNA fehlgepaarte Hybride bildet. In den folgenden Schritten wird die Oligonukleotidkomponente dieser Hybride enzymatisch geschnitten. Anschließend werden die Oligonukleotid-Fragmente von der DNA getrennt und detektiert. Aus dem Signal lässt sich

dann auf den Methylierungsstatus der DNA schließen. Durch einen Überschuss an Oligonukleotiden lässt sich der Prozeß wiederholen. Das Signal kann so amplifiziert werden.

- 5 Die Reaktionskomponenten und Reaktionsbedingungen entsprechen denen für die Mutationsanalyse beschriebenen (Bazar et al., a.a.o.1999; US 5,656,430). So sind die Oligonukleotidsonden bevorzugt zwischen 20 und 50 Nukleotide lang. Die Oligonukleotidsonden tragen bevorzugt
- 10 Farbstoffe oder andere nachweisbare Markierungen, die eine spätere Detektion erleichtern. Die Fehlpaarungen und die Enzyme müssen so ausgewählt sein, dass nur die Oligonukleotidkomponenten der Hybride geschnitten werden. Dabei ist zu beachten, dass bei der Bisulfitumwandlung un-
- 15 methyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt wird, während Methylcytosin unverändert bleibt. Als mögliche Fehlpaarungen stehen daher für den Nachweis eines unmethylierten Strangs U \leftrightarrow G und für den Nachweis eines methylierten Strangs C \leftrightarrow A zur Verfügung. Dementsprechend müssen die
- 20 eingesetzten Oligonukleotide entweder ein G oder ein A tragen. Die verwendeten Enzyme schneiden entweder ein G an einer U \leftrightarrow G-Fehlpaarung oder ein A an einer C \leftrightarrow A-Fehlpaarung. Wird die zu untersuchende DNA nach der Bisulfitbehandlung zunächst amplifiziert, so können auch
- 25 T \leftrightarrow G, A \leftrightarrow C oder G \leftrightarrow T Fehlpaarungen ausgenutzt werden (s.o.). Dabei tragen die Oligonukleotide ein G, C oder T. Ein Schnitt einer G \leftrightarrow T-Fehlpaarung am T ist etwa durch den Einsatz des kommerziell erhältlichen TDG-Enzyms möglich (s.o.).
- 30
- 35 Die Hybridisierung der Oligonukleotidsonden an die DNA erfolgt bevorzugt unter stringenten Bedingungen. Die Reaktionsparameter sind vorzugsweise so gewählt, dass die Bindung der Sonde an die DNA nach dem enzymatischen Schnitt thermodynamisch instabil wird, so dass die geschnittenen Fragmente von der DNA abfallen. Diese Bindungsstellen können dann von noch unverbrauchte Sonden

5 dungsstellen können dann von noch unverbrauchte Sonden
besetzt werden. Gleichwohl sind auch Ausführungsformen
möglich, in denen ein Fragment der Sonde an der DNA ge-
bunden bleibt und etwa mit markierten Oligonukleotiden
verlängert wird (vgl.: US 5,656,430). Es gehört zudem zum
Stand der Technik, helixdestabilisierender Moleküle ein-
zusetzen. Auch ist bekannt, dass der Einsatz hitzestabi-
ler Reparaturenzyme die Sensitivität des Verfahrens er-
höht (Bazar et al., a.a.o.1999; US 5,656,430).

10

Im letzten Schritt dieser Ausführungsform erfolgt ein
Nachweis der geschnittenen Oligonukleotidfragmente. Dem
Fachmann sind hier eine Vielzahl von technischen Detekti-
onsmöglichkeiten geläufig, etwa über Gel- oder Kapillare-
15 lektrophore oder über Fluoreszenz-Resonanz-Energie-
Transfer (FRET, vgl.:US 5,656,430).

20

In US 5,656,430 sind weitere Verfahrenvariationen des Mi-
das-Verfahrens zur Mutationsanalyse beschrieben. Diese
Ausführungsformen sind entsprechend zur Methylierungsana-
lyse anwendbar sind und sind daher auch Teil dieser Er-
findung.

25

Eine andere besonders bevorzugte Ausführungsform des er-
findungsgemäßen Verfahrens nutzt die Bildung von fehlge-
paarten Hybride vor allem aus, um die Hintergrund-DNA zu
entfernen. Diese Ausführungsform ist dadurch gekennzeich-
net, dass

30

a) die zu untersuchende DNA chemisch oder enzymatisch
so umgesetzt wird, dass 5-Methylcytosin unverändert
bleibt, während unmethyliertes Cytosin in Uracil o-
der in eine andere Base umgewandelt wird, die sich
im Basenpaarungsverhalten von Cytosin unterscheidet,

35

b) die umgewandelte DNA mit Oligonukleotiden hybridi-
siert wird, wobei die Hintergrund-DNA Hybride mit
Basenfehlpaarungen bildet,

- c) der DNA-Strang der fehlgepaarten Hybride enzymatisch geschnitten wird,
- d) die ungeschnittene DNA nachgewiesen wird,
- e) aus dem Signal auf den Methylierungsstatus der untersuchten DNA geschlossen wird.

Auch in dieser Ausführungsform wird die nachzuweisende DNA zunächst enzymatisch oder chemisch vorbehandelt. Bevorzugt wird eine Bisulfit-Umwandlung durchgeführt (s.o.). Die Oligonukleotide binden anschließend an die nachzuweisende DNA ohne Fehlpaarung. Die Hintergrund-DNA bildet dagegen fehlgepaarte Hybride, die anschließend mit Hilfe eines Enzyms spezifisch geschnitten werden. Die ungeschnittene DNA wird anschließend bevorzugt amplifiziert. Die Amplifikate werden nachgewiesen, und aus dem Signal wird auf den Methylierungsstatus der DNA geschlossen.

Die Oligonukleotide tragen bevorzugt zwischen 10 und 100, besonders bevorzugt zwischen 20 und 50 Nukleotide. In besonderen Ausführungsformen der Erfindung dienen die Oligonukleotide gleichzeitig als Primer oder Sonden in einer anschließenden Amplifikation (s.u.). Werden die Oligonukleotide nicht als Primer eingesetzt, so sind sie bevorzugt so aufgebaut, dass sie nicht von einer in der Amplifikation eingesetzten Polymerase verlängert werden können. Dies geschieht etwa durch den Einsatz von 3'-Desoxyoligonukleotiden oder von an der 3'-Position anderweitig funktionalisierten Oligonukleotiden, beispielsweise 3'-O-Acetyloligonukleotiden. Zudem sind die Oligonukleotide bevorzugt so aufgebaut, dass sie im Zuge der Amplifikation nicht von der Polymerase degradiert werden. Dies kann etwa durch Thioatbrücken am 5'-Ende erfolgen. Eine andere Möglichkeit ist es, Polymerasen zu verwenden, die über keine Nukleaseaktivität verfügen. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung dient das Oligonukleotid allerdings als sog. Tagman-Sonde. Ein Ab-

nukleotid allerdings als sog. Taqman-Sonde. Ein Abbau der Sonde durch die Polymerase muss hier gerade gewährleistet sein (s.u.).

- 5 Die Oligonukleotide werden bevorzugt in Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ bis 10 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Die Konzentrationen der übrigen Komponenten sind bevorzugt so gewählt, dass sie denen der nachfolgenden Amplifikation entsprechen (etwa: 50-100 mmol/l KCl, 10 mmol/l Tris; 1,5-5
- 10 mmol/l Mg^{2+} , pH 8,5-9,0). Die Hybridisierungsbedingungen sind im übrigen so gewählt, dass eine spezifische Hybridisierung unter Bildung der gewünschten Fehlpaarungen erfolgt. Einzelheiten zur Bestimmung von Hybridisierungsbedingungen sind dem Fachmann bekannt. Zum Stand der Technik gehört etwa auch die Verwendung von Oligonukleotiden,
- 15 die einen sog. „Minor Groove“-Binder tragen (ABI). Eine spezifische Bindung auch kurzer Oligonukleotide ist damit möglich.
- 20 In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Oligonukleotide mehrere methylierungsspezifische Positionen, so dass es bei der Hybridbildung mit der Hintergrund-DNA zu mehreren Basenfehlpaarungen kommt. Hierdurch wird die